

METHOD FOR IDENTIFYING AND DETECTING BACTERIUM WITH DNA GYRASE GENE

Patent number: JP7213299
Publication date: 1995-08-15
Inventor: YAMAMOTO SATOSHI; HARAYAMA SHIGEAKI
Applicant: KAIYO BIO TECHNOL KENKYUSHO KK
Classification:
- international: C12Q1/68; C12N15/09
- european:
Application number: JP19940011052 19940202
Priority number(s): JP19940011052 19940202

Abstract of JP7213299

PURPOSE:To accurately detect and identify a bacterium playing an important role in a medical field, various industrial fields, and environmental maintenance in the level of genes by identifying the bacterium with the base sequence of the DNA gyrase gene of the bacterium. **CONSTITUTION:**When a bacterium is identified with the base sequence of the DNA gyrase gene of the bacterium, at least the partial base sequence of a gyrase B sub-unit coding an amino acid sequence nipped with an amino acid sequence of formula I and an amino acid sequence of formula II on the DNA gyrase B sub-unit is multiplied by a PCR method using a DNA coding the amino acid sequences of formulas I and II. Thus, the kind and strain of the bacterium can more accurately defined than by conventional methods, and the bacterium can be detected and identified, thereby enabling to utilize this method for the diagnosis of infectious diseases, the developments of microorganism environmental clarification systems, the control of food production processes, etc.

His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp

I

Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly

II

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-213299

(43) 公開日 平成7年(1995)8月15日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	9453-4B		
// C 1 2 N 15/09		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平6-11052	(71) 出願人	591001949 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 東京都文京区本郷二丁目35番10号
(22) 出願日	平成6年(1994)2月2日	(72) 発明者	山本 敏 岩手県釜石市平田第3地割75-1
		(72) 発明者	原山 重明 岩手県釜石市平田第3地割75-1
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 DNAジャイレース遺伝子による細菌の同定・検出法

(57) 【要約】

【構成】 細菌のDNAジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定を行うことを特徴とする、細菌の同定・検出法。

【効果】 従来より正確に細菌の種や株の定義を行うことが可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細菌の DNA ジャイレース (gyrase) 遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定を行うことを特徴とする、細菌の同定法。

【請求項 2】 塩基配列が、少なくとも DNA ジャイレース (gyrase) B サブユニット上の His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列と Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレース B サブユニットの部分塩基配列であることを特徴とする、請求項 1 記載の細菌の同定法。

【請求項 3】 細菌の DNA ジャイレース (gyrase) 遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の検出を行うことを特徴とする、細菌の検出法。

【請求項 4】 塩基配列が、少なくとも DNA ジャイレース (gyrase) B サブユニット上の His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列と Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレース B サブユニットの部分塩基配列であることを特徴とする、請求項 3 記載の細菌の検出法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】 本発明は、医学・各種産業（食品・化学等）領域及び環境保全（水処理・汚染物質の生物分解）において重要な役割を担う細菌を、遺伝子レベルで同定・検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、細菌の同定には、糖の資化性等の生化学検査が用いられてきた。しかし、これらを用いた検査はその検査項目が非常に多く煩雑で時間がかかり、にもかかわらず正確な結果を得ることが困難であった。近年では 16S rRNA の塩基配列を用いた微生物種の遺伝子レベルの解析が行われている。しかし、16S rRNA は分子進化速度が遅く、近縁の菌種間ではその差異は微々たるものである。このため、16S rRNA シークエンスを用いた同定システムでは細菌の種や株の判定は困難であった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 細菌を高い精度で分類・同定またはモニターするには遺伝子レベルでの比較・検出を行うことが望ましいが、このためには遺伝子のシークエンス情報を、任意の細菌について容易に入手することが必要不可欠となる。前述の rRNA 遺伝子は種間を通して保存性の高い DNA 塩基配列を有し、この配列をいわゆるユニバーサルプライマーとして用いることによって、ほとんどの細菌種において比較的容易に PCR 増幅を行うことができ、また、その増幅断片からシークエンスを行うことができる。しかし、他の構造遺伝子ではこのような種間を通して保存された DNA 塩基配列

は存在しないため、これまでは同様の方法でシークエンス情報を入手することはできなかった。このため従来はシークエンスを行うために 1 種ごとにクローニング操作を行わなくてはならず、分類・同定といった目的にこれらの遺伝子を応用することは事実上不可能だった。

【0004】 本発明の目的は、任意の細菌から遺伝子のシークエンス情報を容易に入手する方法を確立し、簡便でかつ精度の高い細菌の同定・検出方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記目的を達成すべく研究を重ねた結果、細菌に普遍的に存在する DNA ジャイレース蛋白上に種間を通して保存性の高いアミノ酸配列が存在することを見出し、この知見に基づき本発明を完成するに至った。即ち、本発明の第一は、細菌の DNA ジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定を行うことを特徴とする、細菌の同定法である。ここで塩基配列としては、DNA ジャイレース B サブユニット上の His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列と Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレース B サブユニットの部分塩基配列を用いることができる。

【0006】 また、本発明の第二は、細菌の DNA ジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の検出を行うことを特徴とする、細菌の検出法である。ここで塩基配列としては、DNA ジャイレース B サブユニット上の His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列と Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレース B サブユニットの部分塩基配列を用いることができる。

【0007】 以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、細菌の DNA ジャイレース遺伝子の塩基配列を用いて当該細菌の同定・検出を行うものである。具体的には、DNA ジャイレース遺伝子上の特定の塩基配列を含む DNA 断片を PCR 法により増幅し、ついでジデオキシ法等により DNA 断片の塩基配列を決定し、この塩基配列に基づき細菌の同定・検出を行うものである。

【0008】 PCR 法に用いるプライマーとしては、His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むセンスプライマーと Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むアンチセンスプライマーの 2 種類のプライマーを用いる。それぞれのプライマーの鋳型 DNA 結合部位は *E. coli* K12 株 ジャイレース B サブユニットアミノ酸配列 (GYRB ECOLI [SWISS-PROT]) の pos. 97-104, pos. 495-501 に相当する。これらのプライマーを用いることにより、DNA ジャイレース B サブユニット上の His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp で表されるアミノ酸

配列と Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly で表されるアミノ酸配列に挟まれるアミノ酸配列をコードするジャイレース B サブユニットの部分塩基配列を含む DNA 断片を増幅することができる。また、上記センスプライマーおよびアンチセンスプライマーは、図 1 及び図 2 に示すように 7 および 8 アミノ酸配列にもとづいて設計されている。図が示すようにセンスプライマーでは C 末端側のアスパラギン酸に対応するコドンの 3 番目の塩基を削除し、またアンチセンスプライマーでは N 末端側のグリシンに対応するコドンの 3 番目の塩基を固定することにより、それぞれのプライマーを 5 1 2 種類の混合としている。

【0009】このようなミックスプライマーによる増幅断片は、その塩基配列全体が未知でプライマー配列が得られないため直接シーケンスを行うことができない。そこで本発明では図 3 に示したようにあらかじめプライマー 5' 末端に既知の配列を付加しておき、この塩基配列をシーケンスプライマーとして用いることによって増幅断片より直接塩基配列を求める。なお、本法によりシーケンスできるのは各プライマーより 350bp 程度である。

【0010】増幅された DNA 断片の塩基配列は、ジデオキシ法等の公知の塩基配列決定法により求めることができる。この塩基配列は、実施例に示すように、同属種間あるいは株間で異なっており、その相違度は、同一種間で比較を行った場合、16S rRNA の塩基配列に比べ顕著に高く、このため、16S rRNA のように複数のプライマーを用いて長い塩基配列を決定する必要がない。このような塩基配列の特異性を利用し、得られた DNA ジャイレース遺伝子塩基配列情報をいわゆる signature 塩基配列として用いることができ、これにより複雑な生化学検査を行うことなしに簡便かつ高精度に菌の同定を行うことができる。また、求めた塩基配列をそのままプローブに利用することもでき、さらには近縁菌種の塩基配列を同様に求めて多重比較を行うことにより、種あるいは株レベルでの非常に高い特異性を有するプローブの作成が可能である。これらのプローブにより、未知の菌を多数含む天然菌叢中でも目的とする菌を特異的に検出できる。また、容易に菌を遺伝子レベルで表現できるため、未同定の新種の記述を行うことが可能である。

【0011】本発明により同定・検出できる細菌は、グラム陰性菌の大部分とグラム陽性菌の一部である。具体的な属を例示すると、エッシャーシア属、シュードモナス属、アシネトバクター属、サルモネラ属、バチルス属等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0012】

【実施例】

実施例：グラム陰性菌同定への応用

図 3 に示したプライマーを用いて、エッシャーシア属 1 株 (*E. coli* K12)、シュードモナス属 4 株 (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas alkanoxytica*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa*)、アシネトバクター属 14 株 (*A. calcoaceticus* CIP81.08, *A. baumannii* CIP70.34, *Acinetobacter* sp.3 CIP70.29, *A. haemolyticus* CIP64.3, *A. junii* CIP64.5, *Acinetobacter* sp.6 CIPA165, *A. johnsonii* CIP64.6, *A. lwoffii* CIP64.10, *Acinetobacter* sp.9 CIP70.31, *Acinetobacter* sp.10 CIP70.12, *Acinetobacter* sp.11 CIP63.46, *Acinetobacter* sp.12 SEIP12.81 : CIP 及び SEIP はパスツール研究所の保存番号である) と未同定の新規炭化水素分解菌 T 4 株及び SM-8 4L 株の DNA ジャイレース遺伝子の PCR 増幅を試みた。

【0013】この結果すべての株でほぼ単一の増幅産物を得ることができた。この増幅産物より図 3 に示したシーケンスプライマーを用いて、ジデオキシ法により塩基配列を求めた。*E. coli* K12, *Pseudomonas putida* のアミノ酸配列データはデータベースに登録されたデータと一致した。次に、上記と同様の方法で T 4 株の塩基配列と *Acinetobacter* 属 3 株の塩基配列を求め、両者の塩基配列を比較した。この結果を図 4 に示す。図に示すように T 4 株は *Acinetobacter* 属に属し、ATCC 31012 株に最も近い新種であることが確認された。また、*Acinetobacter* 属内でも DNA ジャイレース遺伝子の塩基配列は異なっており、*Acinetobacter calcoaceticus* の種内でも株により違いが認められた。即ち、DNA ジャイレース遺伝子の塩基配列を比較することにより菌株を判別することができた。また、得られた塩基配列より T 4 株に特異的な PCR プライマーを作出し、増幅の有無によって ATCC 31012 株と判別することが可能であった。

【0014】

【発明の効果】本発明により、従来より正確に細菌の種や株の定義を行うことが可能となる。これは、例えば、感染症の診断などに利用することができ、また、複雑な菌叢から特定の細菌の消長を追うことが可能となり、微生物環境浄化システムの開発、食品製造工程の管理等にも利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明に用いるセンスプライマーを示す。

【図 2】 本発明に用いるアンチセンスプライマーを示す。

【図 3】 本発明に用いるシーケンスプライマーの一例を示す。

【図 4】 T 4 株、及び公知のアシネトバクター属菌株の塩基配列を示す。

【図 1】

センスプライマー

Glu-Val-Ile-Met-Thr-Val-Leu-His-Ala-Gly-Gly-Lys-Phe-Asp	
GAA GTT ATT ATG ACT GTT TTA	CAT GCT GGT GGT AAA TTT GAT
GAG GTC ATC ACC GTC TTG	CAC GCC GGC GGC AAG TTC GAC
GTA ATA ACA GTA CTT	GCA GGA GGA
GTG ACG GTG CTC	GCG GGG GGG
CTA	プライマー部
CTG	

削除して使用せず

注：下線部はアミノ酸保存性配列およびそれに対応するプライマー配列を示す。

【図 2】

アンチセンスプライマー

Met-Thr-Asp-Ala-Asp-Val-Asp-Gly-Ser-His-Ile-Arg-Thr-Leu	
ATG ACT GAT GCT GAT GTT GAT GGT	TCT CAT ATT CGT ACT TTA
ACC GAC GCC GAC GTC GAC GGC	TCC CAC ATC CGC ACC TTG
ACA GCA GTA GGA TCA	ATA CGA ACA CTT
ACG GCG GTG GGG TCG	CCG ACG CTC
プライマー部	固定AGT
	AGC AGG CTG

注：下線部はアミノ酸保存性配列およびそれに対応するプライマー配列を示す。

【図 3】

センスプライマー

>PCRプライマー

Gp-1: 5'-gaagtcatcatgaccgttctgca(tc)gc(agtc)gg(agtc)gg(agtc)aa
(ag)tt(tc)ga-3' = 41mer ():Mix

一部共有

>シーケンスプライマー

Gp-s1: 5'-gaagtcatcatgaccgttctgca-3' = 23mer

アンチセンスプライマー

>PCRプライマー

Gp-R2: 5'-agcagggtacggatgtgcgagcc(ag)tc(agtc)ac(ag)tc(agtc)gc
(ag)tc(agtc)gtcat-3' = 44mer ():Mix

一部共有

>シーケンスプライマー

Gp-sR2: 5'-agcagggtacggatgtgcgagcc-3' = 23mer

注：下線部はアミノ酸保存性配列およびそれに対応するプライマー配列を示す。

【図 4】

gyrB 核酸塩基配列の種内変異の一例

本発明を用いて決定された gyrB 核酸塩基配列の *Acinetobacter calcoaceticus* 3 株および新規炭化水素分解菌 *Acinetobacter* sp. T4 における相違を示す。本結果より T4 特異 PCR プライマーを作成した。

```

CIP81.08    1:ACAGTTATAAGGTTTCAGGTGGTTACACCGCGTAGGTGTTCTGTAGTAAACGCACATT
ATCC31012   1:....C....A..A..G.....G.G.....T....T..G..C.
ATCC33308   1:.T..CC.....T..C...C.G..TG.T.....G..A..G..C..T..CT.G.
T4          1:CT..C....A..A..G.....TA..G.....T....T..G..C.
              **  ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08    61:CGAGTAAATTACATTTAATGATTCTCGTCTGGTCAAGTGCATGAGCAAGAATATCAAC
ATCC31012   61:.T.AA.....G.....G.C....CA.....G...A.C.....CGCG.
ATCC33308   61:.C..C..GC...G....CC..CA.....GA.C....A..G.....G.
T4          61:.T.AA.....G.....G.C....CA.....G...A.C.....CGCG.
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08    121:ACGCGATCCGCAATATCCATTACGTGTGATTGGTGAACGGATAAGAGTGGTACAACGG
ATCC31012   121:.T..T....A.....T...AAA..TG.G.....T....CATCG..A....C.
ATCC33308   121:.....T..G....GC..AAA...G.C....G..ATC..CC..CG....T..T.
T4          121:.T..T....A.....T...AAA..TG.G.....T....CATCG..A....C.
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08    181:TACGCTTTTGGCCAAAGTGAATTAACAATTACTCAAACCATTTTAAACGTAGAAATTCTAG
ATCC31012   181:.T..T..C.....G.....G.C....GC....G....C.GT..T..T..CT.G.
ATCC33308   181:.....T..C.....GGGAT..T...GC..G..T.....T..T..T....G.
T4          181:.T..T..C.....G.....GG..C....GC....G....C.GT..T..T..CT.G.
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08    241:CACGCCGTTTACGTGAGCTTTTCATTCTTAAACCGGGCGTACGTATTGTTTTACGCGATG
ATCC31012   241:.T..T.....A..A..A.....T....G..T..T..T.....C..AC.G..T....
ATCC33308   241:.....G..T..TC....T..A....TAAA..A..CC.G..T....
T4          241:.T..T.....A..A..A.....T....G..T..T..T.....C..AC.G..T....
              *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

CIP81.08    301:AACGTATTAAACCTTGGACATGTTTTTGACTACGAAGGTGGGTATCTGAGT
ATCC31012   301:....CG.G....C.A....A.C.A...T..T..G.TG..C.....
ATCC33308   301:....G.G...T...AG...A...A..C...T....C..CC.G..A....
T4          301:....CG.G....C.A....A.C.A...T..T..G.TG..T.....
              ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```

*は全ての株で一致した塩基を示す。CIP81.08^T以外の株は、CIP81.08^Tと異なった塩基のみを示した。CIP81.08^T (ATCC23055^T) は *Acinetobacter calcoaceticus* の type strain

CIP, Collection de l'Institut Pasteur

ATCC, American Type Culture Collection

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.